



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 202305538 U

(45) 授权公告日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201120427001. 6

(22) 申请日 2011. 10. 18

(73) 专利权人 武汉优尔生科技股份有限公司

地址 430056 湖北省武汉市武汉经济技术开发区
零部件区 II-2 地块 (通达伟业大厦)

(72) 发明人 何峰容 李华渊 杨娟 章秀波
汪景

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

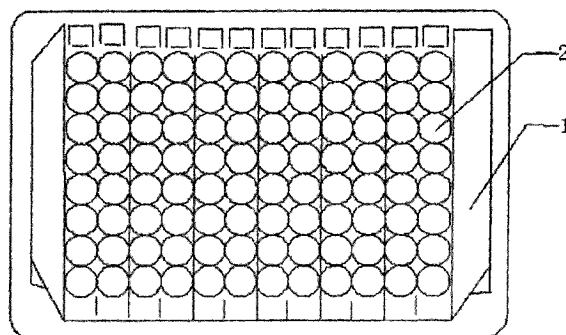
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 实用新型名称

血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒

(57) 摘要

本实用新型提供了一种血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒,包括盒盖 (4)、内部的酶标板 (5) 和盒体 (6),其中酶标板 (5) 包括固相载体 (1) 和包被层 (3),固相载体 (1) 为设置有多个微孔的微孔板 (2),包被层 (3) 附着在所述固相载体 (1) 的微孔表面,包被层 (3) 是由 AngII 和牛血清白蛋白依次涂布在固相载体 (1) 的微孔表面上形成的复合层。固相载体 (1) 为 96 孔聚苯乙烯试剂板。本实用新型通过噬菌体抗体展示的方法筛选得到与 AngII 结合的抗体片段,并通过负向筛选去除与 AngI 和 AngIII 交叉结合的抗体,由此进一步提高了抗体的特异性。



1. 一种血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒,包括盒盖(4)、内部的酶标板(5)和盒体(6),其中酶标板(5)包括固相载体(1)和包被层(3),其特征在于:所述固相载体(1)为设置有多个微孔的微孔板(2),所述包被层(3)附着在所述固相载体(1)的微孔表面,所述包被层(3)是由 AngII 和牛血清白蛋白依次涂布在固相载体(1)的微孔表面上形成的复合层。

2. 根据权利要求1所述的血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征是,所述固相载体(1)为96孔聚苯乙烯试剂板。

3. 根据权利要求1所述的血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征是,所述固相载体(1)为48孔聚苯乙烯试剂板。

4. 根据权利要求1所述的血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征是,所述固相载体(1)为60孔聚苯乙烯试剂板。

血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及生物技术领域,尤其涉及一种血管紧张素 II (AngII) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒。

背景技术

[0002] 肾素-血管紧张素系统 (RAS) 在调节血压、电解质及体液平衡等生理功能中发挥重要作用。血管紧张素原 (AGT) 主要由肝脏合成并释放入血,在肾素的作用下生成 10 肽化合物,即血管紧张素 I (AngI), AngI 在血管紧张素转换酶 (ACE) 作用下生成 8 肽 AngII,后者再通过 ACE 作用产生 7 肽的 AngIII。其中 AngII 是 RAS 的主要效应分子,通过作用于血管紧张素 II 受体 1 (AT1) 和 AT2 受体,在调节血压、管球反馈、肾小管对水钠的重吸收、肾脏发育及心血管疾病的发生发展中占有重要地位。病理状态下,AngII 在高血压、动脉粥样硬化以及继发性的室肥厚等进程中发挥重要作用;同时,在糖尿病患者中,AngII 可以直接或间接地抑制胰岛素信号途径,加重胰岛素抵抗。同时,该物质也可作为预测糖尿病患者发生心血管事件的危险因素。

[0003] 噬菌体展示技术是以噬菌体为载体,将完整的抗体可变区片段定向插入噬菌体外壳蛋白基因区,使其产物表达并展示于噬菌体表面,通过吸附-洗脱-扩增的重复过程,筛选获得表达与已知抗原特异性结合的 scFv 片段的噬菌体,并通过基因改造使其成为完整抗体,改造后的抗体即可作为制备 ELISA 试剂盒的原料。由于目前商业化的噬菌体抗体库库容可达 10^{10} - 10^{11} ,使得筛选成功率大大增加,可应用在制备许多难以通过免疫动物获得的抗体中。

[0004] 目前评价 AngII 的直接方法有高效液相色谱法 (HPLC)、放射免疫法 (RIA) 以及酶联免疫吸附法 (ELISA)。其中高效液相色谱法检测范围一般在 2.5-500pg/ml,样本回收率在 90% 以上。但是该方法存在的缺陷也是非常明显的,存在检测仪器费用高、操作繁琐、样本需要前处理等缺点。放射免疫法检测灵敏度较高,但是由于应用到放射性物质,对于实验室的要求较高,且实验废液难处理。相比之下,ELISA 法操作简便,不需大型仪器,同时由于亲和素-生物素放大的系统的应用,极大的提高了其灵敏度。制备 ELISA 和 RIA 试剂盒的重要原料就是针对 AngII 的特异性抗体。传统的抗体制备方法是通过免疫动物,获取能产生抗体的 B 淋巴细胞,在与骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞后,通过筛选得到能产生高亲和力抗体的单克隆 B 细胞,再免疫动物生成富含抗体的腹水。该方法技术成熟,但操作较繁琐,且对抗原的免疫原性要求高。由于 AngII 仅含 8 个氨基酸,其序列为 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe,分子量为 1046.2,免疫原性较弱,不易通过免疫动物获得抗体。

[0005] 抗体是决定 ELISA 试剂盒质量的关键因素,其亲和力、特异性直接关系到试剂盒的灵敏度、准确性以及精确性。因此,有必要选用一种简单有效的方法来获得高质量的抗体。该技术要解决的关键问题是从噬菌体库中筛选针对 AngII 特异性的 scFv 段。由于 AGT 的降解产物有 3 个,依次为 AngI, AngII 和 AngIII,每种之间只有 1-2 个氨基酸的差别,因

此筛选的抗体要避免与 AngII 之外的 2 种片段的交叉反应。为此,在对噬菌体进行常规的正向选择并富集之后,再进行负向选择去除能与 AngI 和 AngIII 结合的抗体,此举可保证最后所得抗体与这两个类似物无交叉反应或反应极弱,对保证试剂盒检测准确性至关重要。

[0006] 其次,噬菌体库表达的仅为抗体的 scFv 片段,不具备传统抗体的双价结合结构,抗原结合力较弱。为此,通过将 AngII scFv 和 IgG3 上游铰链区 /p53 四聚功能域的基因融合,利用 p53 四聚功能域表达产物将 AngII scFv 抗体装配成四聚体,可同时结合四个抗原表位,且在空间位点上不会相互干扰,由此获得的抗体可用于制备抗 AngII 的 ELISA 试剂盒。

实用新型内容

[0007] 本实用新型的目的是提供一种血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒,包括盒盖、内部的酶标板和盒体,其中酶标板包括固相载体和包被层,固相载体为设置有多个微孔的微孔板,包被层附着在所述固相载体的微孔表面,包被层是由 AngII 和牛血清白蛋白依次涂布在固相载体的微孔表面上形成的复合层。

[0008] 优选的,上述固相载体为 96 孔聚苯乙烯试剂板。

[0009] 优选的,上述固相载体为 48 孔聚苯乙烯试剂板。

[0010] 优选的,上述固相载体为 60 孔聚苯乙烯试剂板。

[0011] 本实用新型利用噬菌体抗体展示技术来筛选获得高亲和力的 AngII 抗体,然后将其应用于 ELISA 试剂盒的制备和生产中。该技术模拟了机体体液免疫系统的选择作用,呈现在噬菌体表面的具有不同可变区的抗体通过固相化抗原进行筛选,进而利用噬菌体对大肠杆菌的感染和蛋白表达快速获取特异性抗体。

[0012] 与传统方法相比,该方法能在短期内获得特异性高、亲和力高的抗体,且经筛选获得的噬菌体可以长期保存,在传代中亦可保持基因结构的稳定性。抗体是 ELISA 试剂盒的重要原料,高质量的抗体可以保证试剂盒的高品质,尤其是试剂盒的特异性、灵敏度等方面会有很大的改善。

附图说明

[0013] 图 1 是本实用新型酶标板结构示意图;

[0014] 图 2 是本实用新型酶标板剖视图;

[0015] 图 3 是本实用新型试剂盒结构示意图;

[0016] 图 4 是本实用新型 AngII 的 ELISA 试剂盒标准曲线图。

[0017] 图中:1- 固相载体;2- 微孔;3- 包被层;4- 盒盖;5- 酶标板;6- 盒体。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图对本实用新型作进一步描述。

[0019] 本实用新型提供的血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒制备的主要的技术路线如下:

[0020] 1. 抗 AngII 特异性抗体的正向筛选:

[0021] 购买商业化构建好的噬菌体抗体库,并进行菌液培养进行噬菌体表面呈现。以目

的抗原,即 AngII 对抗体库进行筛选,先将抗体库与 AngII 相互作用,使其充分结合,接着洗涤除去非特异结合噬菌体,最后将特异性结合噬菌体洗脱下来扩增,然后再进入下一轮的淘选。一般需要重复 2-3 轮淘选-洗脱-扩增的过程,最终淘选出亲和力高的特异结合 AngII 的噬菌体抗体。

[0022] 2. 抗 AngII 特异性抗体的负向筛选:

[0023] 具体操作与正向筛选相似,不同的是分别在固相载体上包被 AngI 和 AngIII,然后将上一步收获的表达 AngII 抗体的噬菌体与固相抗原孵育,洗脱后收集洗脱液,即未与 AngI 和 AngII 结合的噬菌体,再次扩增获得与 AngI 和 III 无交叉反应的抗体展示噬菌体。

[0024] 3. 抗 AngII 抗体 scFv 的改造:

[0025] 由于选用的抗体库为 scFv 库,筛选所得抗体只有一个抗原结合区,抗原结合力较弱,需要进一步改造。通过 AngII scFv 和 IgG3 上游铰链区 /p53 四聚功能域的基因融合由于该基因表达产物能自动组装成四聚体,相应的成为四价抗体,可明显的提高对抗原的结合力。将含融合基因的质粒转染至中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中,扩增培养后采用亲和层析法纯化目的抗体,并通过 Western-Blot 和 ELISA 等方法对其亲和性和特异性进行鉴定。

[0026] 4. ELISA 试剂盒的研制:

[0027] 本试剂盒应用竞争抑制酶联免疫分析法测定血清或血浆样本中 AngII 的水平。制备过程如下:使用 96 孔聚苯乙烯试剂板 (PS) 作为固相载体,先将其置于紫外光下辐照 2 小时,使 PS 板活化。在试剂板微孔条上预先包被一定浓度的 AngII,4℃ 过夜,经洗板及牛血清白蛋白封闭处理后制成包被好的酶标板。检测时,依次加入待测标本及生物素化的 AngII 抗体,形成酶标板上包被的 AngII 和标本中的 AngII 竞争结合抗 AngII 抗体的局面,再通过亲和素化辣根过氧化物酶 (HRP) 放大信号,以 3,3',5,5' -四甲基联苯胺 (TMB) 及硫酸分别作为底物及终止液,完成血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒的制备。

[0028] ELISA 试剂盒较 RIA 试剂盒有诸多优点,通过与 Phoenix Pharmaceuticals, Inc. 生产的 RIA 试剂盒进行比较,可见其操作更简单、无需特殊的实验条件且对环境 and 操作人员影响小,适用于普通实验室的应用。

[0029] ELISA 试剂盒与 RIA 试剂盒比较结果如表 1 所示。

[0030]

	ELISA 试剂盒	RIA 试剂盒
样本前处理	不需	抽提样本中多肽
所需样本量	50ul	1ml

[0031]

操作时间	5 小时	2 天
灵敏度	6.8pg/ml	31pg/ml
检测范围	12.35-1000pg/ml	10-1028pg/ml
实验室条件	无需特殊条件	实验室内可冲洗，专用通风、水槽系统
操作人员要求	普通防护服及手套	特殊防护服及眼镜
废液处理	废液稀释后可释放	废液需要集中深埋处理

[0032] 表 1

[0033] 本实用新型提供的血管紧张素 II (AngII) 酶联免疫吸附测定试剂盒的特异性检测。其他类似物的交叉反应率如表 2 所示：

[0034]

类似物	交叉反应率
AngI	< 0.5%
AngIII	< 1%
Leu-Heptapeptide	< 0.3%
otensin III	< 0.01%
Neurotensin	< 0.01%
Substance P	< 0.01%
Vasopressin	< 0.01%
Endothel in-1	< 0.01%
BNP-32	< 0.01%
Alpha-ANP(1-28)	< 0.01%

[0035] 表 2

[0036] 由此可见试剂盒特异性较高，与 AngII 的类似物交叉反应率低，极大的增强了检测结果的准确性。

[0037] 本实用新型提供的血管紧张素 II (AngII) 酶联免疫吸附测定试剂盒的回收率检测。

[0038] 取不同浓度的标准品溶液 (AngII 浓度为 50pg/ml、200pg/ml、800pg/ml)，分别加

入质控阴性血清中,用该试剂盒检测,并比较测定值和预期值得到回收率。比较结果如表 3 所示:

[0039]	标准品(pg/ml)	O.D.值	均值	浓度值 (pg/ml)	回收率
	50	1.147 1.121	1.134	45.66	91.32%
	200	0.706 0.672	0.689	204.94	102.47%
	800	0.419 0.371	0.395	769.20	96.15%

[0040] 表 3

[0041] 从比较的结果可以看出,回收率均可达到 90%以上,与预期值偏差较少,受待检样本内容物的影响较小,适合血清及血浆样本的检测。

[0042] 使用本实用新型生产的血管紧张素 II 酶联免疫吸附测定试剂盒检测正常人血清及血浆样本。

[0043] 1. 具体操作步骤如下:

[0044] 1.1 试剂准备:将标准品依次稀释成 1000pg/ml、333.33pg/ml、111.11pg/ml、37.04pg/ml、12.35pg/ml;准备血清及血浆样本各 10 例,均采集自正常人。检测液 A 的配制需使用相应的稀释液按 1:100 比例将检测液 A 贮存液稀释至工作浓度;

[0045] 1.2 加样:分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 5 孔,依次加入 50 μ L 不同浓度的标准品,空白孔加 50 μ L 标准品稀释液,余孔加待测样品 50 μ L,然后立即每孔加检测溶液 A 工作液 50 μ L,振动混匀,酶标板加上覆膜,37°C 温育 1 小时;

[0046] 1.3 洗板:弃去孔内液体,每孔用 350 μ L 的洗涤液洗涤,浸泡 1-2 分钟,甩掉板内液体,重复洗板 3 次。最后一次洗涤后,要把孔内的洗涤液完全甩干;

[0047] 1.4 加检测液 B:检测液 B 贮存液按 1:100 比例稀释后即可使用。每孔加检测溶液 B 工作液 100 μ L,盖上覆膜,37°C 温育 30 分钟;

[0048] 1.5 洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,方法同步骤 2;

[0049] 1.6 显色:每孔加底物溶液 90 μ L,酶标板加上覆膜,37°C 避光显色;

[0050] 1.7 终止反应及读数:待标准曲线梯度明显时每孔加终止溶液 50 μ L,终止反应,并立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(O.D.值)。

[0051] 2. 所得实验结果如下:

[0052] 2.1 血管紧张素 II(AngII)酶联免疫吸附测定试剂盒标准曲线如图 4 所示;血管紧张素 II(AngII)酶联免疫吸附测定试剂盒的各项指标如表 4 所示。

[0053]

浓度 (pg/ml)	浓度 log 值	O.D.值		平均值
0	—	2.564	2.472	2.518
12.35	1.09	1.748	1.756	1.752
37.04	1.57	1.271	1.233	1.252
111.11	2.05	0.8249	0.8361	0.8305
333.33	2.52	0.543	0.529	0.536
1000	3	0.357	0.363	0.36

[0054] 表 4

[0055] 2.2 样本中 AngII 含量的检测结果如表 5 所示：

[0056]

样本	浓度范围 (pg/ml)	均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)
血清 (n=10)	28.9-53.4	42.1	7.6
EDTA 血浆 (n=10)	25.4-48.7	35.6	5.4
肝素血浆(n=10)	23.0-51.2	40.7	8.1

[0057] 表 5

[0058] 本实用新型通过噬菌体抗体展示的方法筛选得到与 AngII 结合的抗体片段,并通过负向筛选去除与 AngI 和 AngIII 交叉结合的抗体,由此进一步提高了抗体的特异性;同时利用 p53 的特性将所得抗体片段组装成四聚体,使其亲和力增加。该抗体的获得简单易操作,周期较短,且完全满足制备 ELISA 试剂盒的要求。经实验证明,使用该抗体制备的 ELISA 试剂盒特异性、准确度及精确度均较高,可以应用于该项指标检测。

[0059] 以上所述之具体实施方式为本实用新型的较佳实施方式,并非以此限定本实用新型的具体实施范围,本实用新型的范围包括并不限于本具体实施方式,凡依照本实用新型之形状、结构所作的等效变化均在本实用新型的保护范围内。

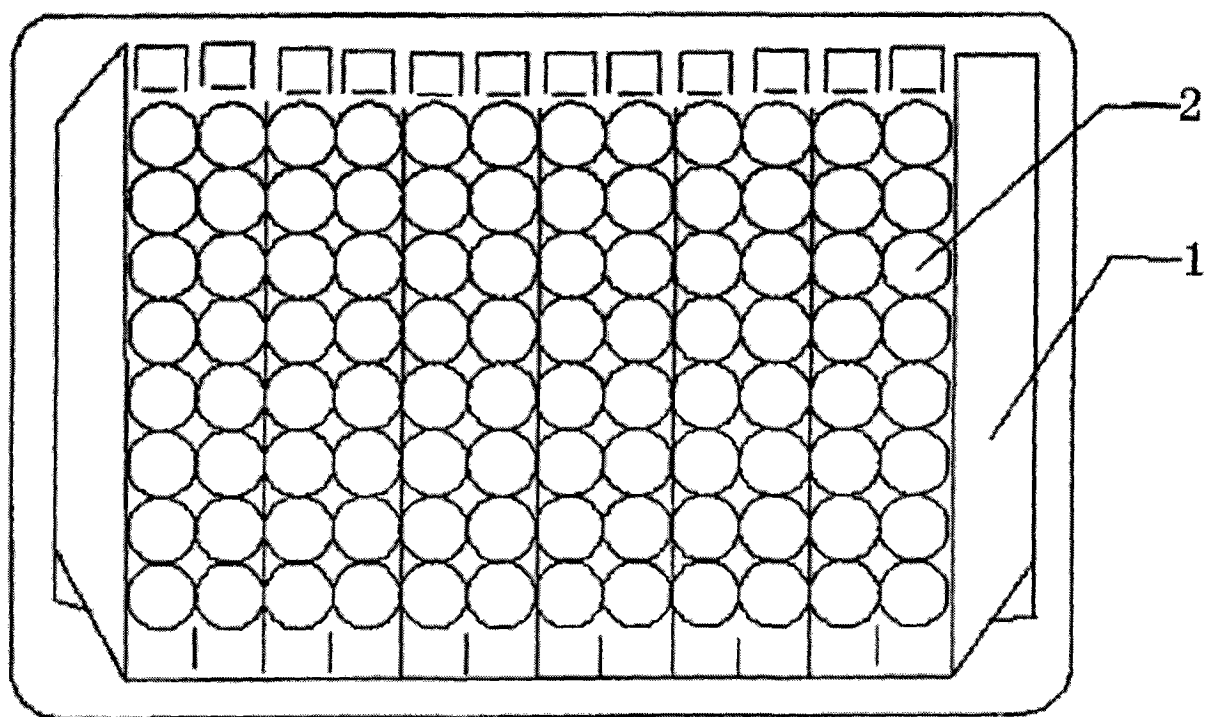


图 1

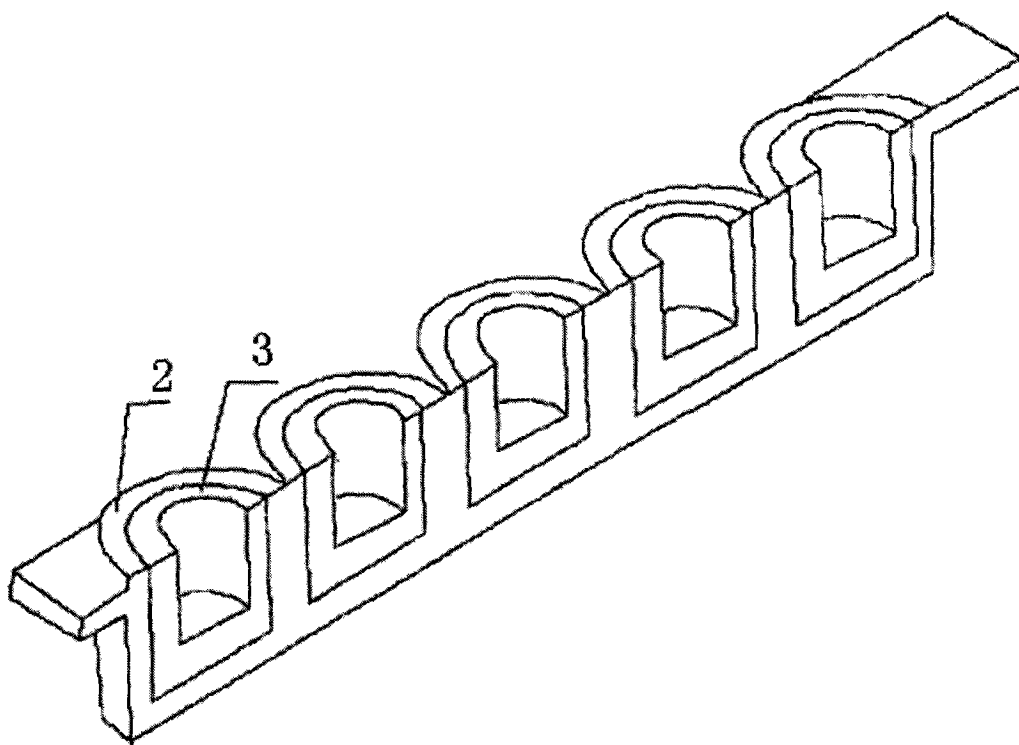


图 2

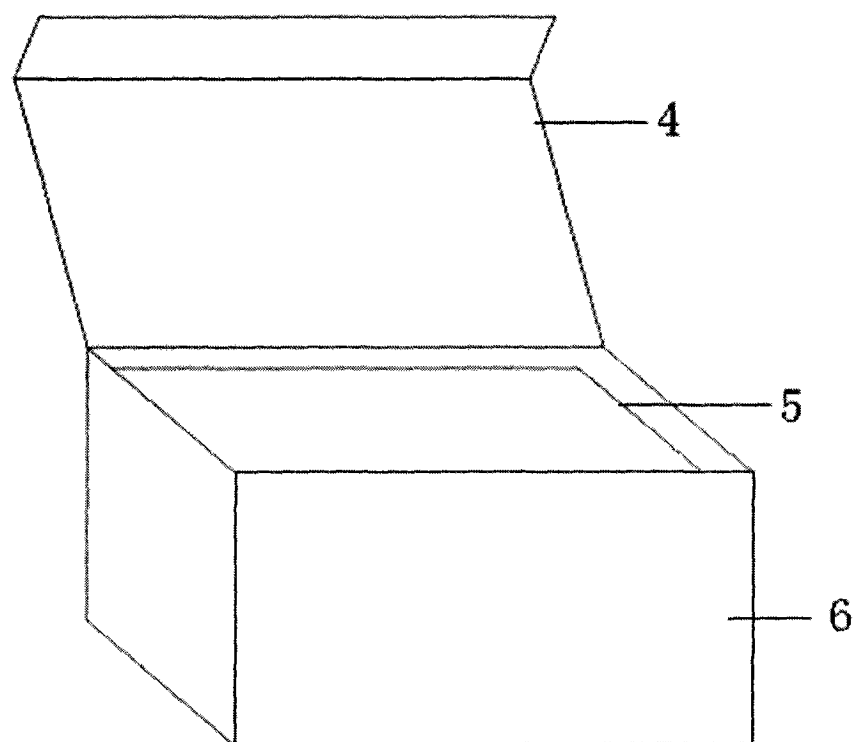


图 3

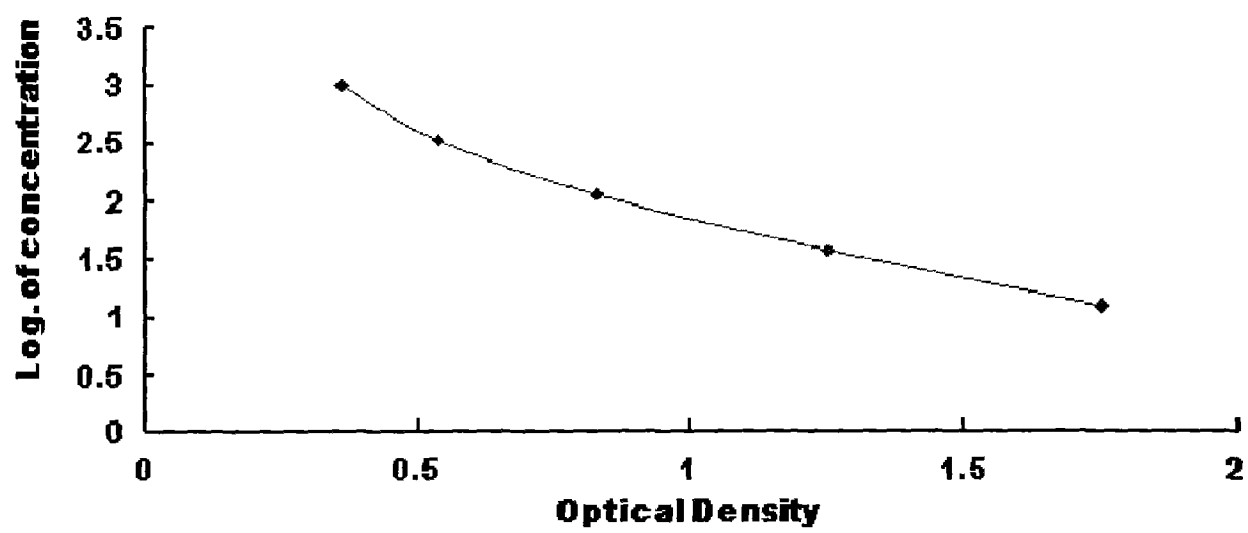


图 4

专利名称(译)	血管紧张素II酶联免疫吸附测定试剂盒		
公开(公告)号	CN202305538U	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201120427001.6	申请日	2011-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
[标]发明人	何峰容 李华渊 杨娟 章秀波 汪景		
发明人	何峰容 李华渊 杨娟 章秀波 汪景		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型提供了一种血管紧张素II酶联免疫吸附测定试剂盒，包括盒盖(4)、内部的酶标板(5)和盒体(6)，其中酶标板(5)包括固相载体(1)和包被层(3)，固相载体(1)为设置有多个微孔的微孔板(2)，包被层(3)附着在所述固相载体(1)的微孔表面，包被层(3)是由AngII和牛血清白蛋白依次涂布在固相载体(1)的微孔表面上形成的复合层。固相载体(1)为96孔聚苯乙烯试剂板。本实用新型通过噬菌体抗体展示的方法筛选得到与AngII结合的抗体片段，并通过负向筛选去除与AngI和AngIII交叉结合的抗体，由此进一步提高了抗体的特异性。

